

文章编号: 1674-7054(2018)03-0274-07

纳米 TiO_2 对斑马鱼超氧化物歧化酶活性的影响

张章¹ 唐文浩¹ 唐天乐^{1,2}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 海南医学院 热带医学与检验医学院, 海口 571199)

摘要: 利用斑马鱼成鱼, 研究金红型纳米 TiO_2 (Titanium dioxide nanoparticles, TiO_2 NPs) 对斑马鱼的氧化损伤效应。以超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 作为生物标志分子, 考察斑马鱼成鱼染毒 10 d 后, 鳃、肝脏和肠 3 种组织内 SOD 水平的变化, 通过酶联免疫吸附反应 (ELISA) 和荧光定量 PCR (Q-PCR), 对 SOD 在蛋白和分子水平的变化进行检测。结果表明: TiO_2 NPs 会导致斑马鱼鳃和肝脏组织内 SOD 活性的降低, 但对肠组织内 SOD 的活性影响不大; 在基因水平上, TiO_2 NPs 会导致 *sod* 基因表达上调 2~3 倍。由此推论, TiO_2 NPs 长期暴露会影响斑马鱼体内的 SOD 水平, 导致鳃和肝脏组织的氧化损伤。

关键词: TiO_2 NPs; 斑马鱼; 超氧化物歧化酶; 酶联免疫吸附反应; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q 55

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.03.002

二氧化钛 (TiO_2) 可形成具有高比表面积的纳米级晶体结构, 即纳米二氧化钛 (titanium dioxide nanoparticles, TiO_2 NPs)。 TiO_2 NPs 主要有 2 种结晶形态: 金红石型 (rutile) 和锐钛型 (anatase), 其中金红石型应用更广泛。 TiO_2 NPs 具备光催化活性和紫外吸收活性, 在日常工业生产中被广泛应用, 特别是在化妆品行业, 因 TiO_2 NPs 在皮肤上呈现较好的透明度, 被大量用于防晒乳等美容护肤产品中^[1]。此外, TiO_2 NPs 还具备抗菌和有机催化功能, 可杀菌和催化降解有机物, 还被用于油墨制造、陶瓷、玻璃、涂料、造纸等多个领域^[2]。 TiO_2 NPs 在生产、使用和废弃处理的过程中, 不可避免地通过大气、土壤、水体等途径进入环境, 其对环境产生的生态效应也逐渐引起人们的关注^[3]。早在 2003 年, 《Science》《Nature》等杂志就对纳米材料的生物安全性提出了一系列问题^[4-5]。研究表明, 纳米材料可以透过细胞膜, 进入细胞和线粒体等细胞器, 诱发机体产生氧化损伤和蛋白质变性、DNA 损伤等效应。 TiO_2 NPs 对生物是否存在毒性效应尚待进一步研究。已有研究表明, TiO_2 NPs 会影响植物对矿物元素的吸收, 从而抑制其生长^[6]; 在动物中, 发现 TiO_2 NPs 与小鼠皮肤暴露接触, 会对其脑和血管造成损伤^[7]。斑马鱼作为一种模式生物, 不仅在神经和发育生物学上有重要应用, 在药物安全评价和生态毒理方面也应用广泛^[8]。笔者利用斑马鱼作为模式生物, 通过成鱼暴露实验, 对 TiO_2 NPs 在诱发氧化损伤方面的效应进行了研究。利用超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 通过酶联免疫吸附反应 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, Q-PCR), 对 TiO_2 NPs 影响下, 斑马鱼肝脏、肠、鳃 3 个组织器官的 SOD 在蛋白和基因水平的变化进行了检测。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器和实验动物 纯度为 99% 的常规 TiO_2 和平均粒径为 25 nm, 纯度为 99.8% 的金红型纳米

收稿日期: 2018-04-22

修回日期: 2018-05-07

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目 (318MS060); 中西部高校提升综合实力工作资金资助项目 (ZXBHJH-XK004)

作者简介: 张章 (1989-), 女, 海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生。E-mail: zhang112233@126.com

通信作者: 唐天乐 (1985-), 男, 博士, 讲师。研究方向: 环境毒理学。E-mail: ttl_0114@163.com

(rutile- TiO_2 型号 T104942) 购自上海 Aladdin 生化科技股份有限公司; SOD ELISA 试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司; Total RNA 提取试剂(TRI Reagent Solution)、反转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) 和荧光定量试剂盒(SYBRTM Select Master Mix) 购自赛默飞世尔科技(中国) 有限公司(Thermo Fisher Scientific); 磷酸盐缓冲液(PBS) 购自生工生物工程(上海) 股份有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯; 引物的合成由广州天一辉远基因科技有限公司完成。

超声破碎仪(美国 SONICS)、透射电子显微镜 JEM 2100(日本 JOEL)、多功能酶标仪 SpectraMax M2(美国 Molecular Devices)、小型水平电泳仪(美国 Bio-Rad)、荧光定量 PCR 仪(美国 ABI)。

实验用斑马鱼(*Danio rerio*) 购于海口市花鸟市场, 市售成年斑马鱼(雌雄各半), 体长(2.54 ± 0.26) cm, 体质量(0.51 ± 0.03) g。室温实验室条件下驯养 3 个月, 养殖用水为自来水经 PP 棉/活性炭过滤后且曝气 48 h 以上, 加热棒调节水温控制在(26 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 范围内, pH7.0 ~ 7.3, 氧气泵增氧, 水中溶解氧为(8.23 ± 0.08) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。养殖期间自然光照 14 h/10 h(昼/夜); 每天早晚各喂食 1 次。

1.2 TiO_2 NPs 的物理化学表征 实验采用透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM) 对常规 TiO_2 和 TiO_2 NPs 的粒径大小进行表征。将 2 种材料称重后, 分别分散在 ddH₂O 中, 制备成浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的悬浮溶液, 利用透射电镜观察之前, 悬浮溶液冰浴在超声仪中超声 20 min(50 W, 40 kHz), 保证材料分散均匀。将悬浮液滴至铜网上, 室温干燥, 利用透射电镜观察常规 TiO_2 和 TiO_2 NPs 在液体中的分布形态。透射电镜操作由海南大学分析测试中心完成。另外利用 SpectraMax M2 多功能酶标仪进行波长扫描分析, 扫描范围 200 ~ 600 nm, 检测不同浓度 TiO_2 NPs 溶液(10, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 光吸收特性。

1.3 斑马鱼成鱼暴露毒性试验 根据预实验 TiO_2 NPs 的溶解状况, 成鱼 TiO_2 NPs 暴露液的浓度分别设置为 10, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设置正常成鱼养殖水和常规 TiO_2 (100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 作为对照。每个浓度配制 5 L 暴露液并放入 20 条成年斑马鱼(雌雄各半), 光照/黑暗周期为 14 h/10 h。成鱼暴露实验 10 d, 每天更换新鲜暴露溶液, 确保水质和暴露液稳定。暴露实验结束后, 每个浓度取 6 条鱼为 1 组, 冰上解剖取斑马鱼的肝脏、肠和鳃 3 种组织。取出的组织用预冷的 PBS 缓冲液漂洗干净后称重、匀浆。匀浆样品 $12\ 000 \times g$ 离心 30 min, 取上清, -80°C 保存。上清样品可用于检测斑马鱼不同组织中的 SOD 含量。成鱼实验重复 3 次。

1.4 斑马鱼 3 种组织中 SOD 含量的 ELISA 检测 考察斑马鱼肝脏、肠和鳃 3 个组织内 SOD 的水平。ELISA 实验步骤按照试剂盒说明书操作。在酶标包被板上依次加入 40 μL 样品稀释液体和 10 μL 组织上清液; 封板后, 37°C 温育 30 min, 洗涤后加入酶标试剂 50 μL , 温育洗涤后加 50 μL 显色剂, 37°C 显色 10 min, 显色完成后加终止液 50 μL 终止。利用酶标仪 450 nm 波长下测定斑马鱼肝脏、肠和鳃 3 种组织中的 SOD 的含量, 根据标准曲线计算 SOD 的浓度。

1.5 斑马鱼 3 种组织 *sod* 基因的表达分析 *sod* 基因序列从 NCBI(NM_131294) 获取, 针对斑马鱼的 *sod* 基因, 利用 Primer 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物(表 1), 内参基因选择 β -actin。提取不同浓度暴露液组的斑马鱼的 3 个组织(肝脏、肠和鳃) 样本的 Total RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。确认无误后, 利用反转录试剂盒, 通过体外转录获得对应的 cDNA 模板。利用 Q-PCR 考察 3 个组织内 *sod* 基因表达量的变化。Q-PCR 使用 SYBR Green 染料法, 样品和内参均设 3 个复管, PCR 反应条件见表 2, 结果处理采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法。

表 1 超氧化物歧化酶基因和 β -激动蛋白基因引物

Tab. 1 Primer sequence of *sod* and β -actin genes

Gene name	Forward Primer(5' - 3')	Reverse primer(5' - 3')
Cu/Zn- <i>sod</i>	CAAGAGGGTGAAGAAGCCA	GGTCACATTACCCAGGTCTCC
β -actin	CACAGTGCTGTCTGGAGGTAC	CATTTAAGGTGGCAACAGTTC

表2 荧光定量 PCR 反应扩增条件

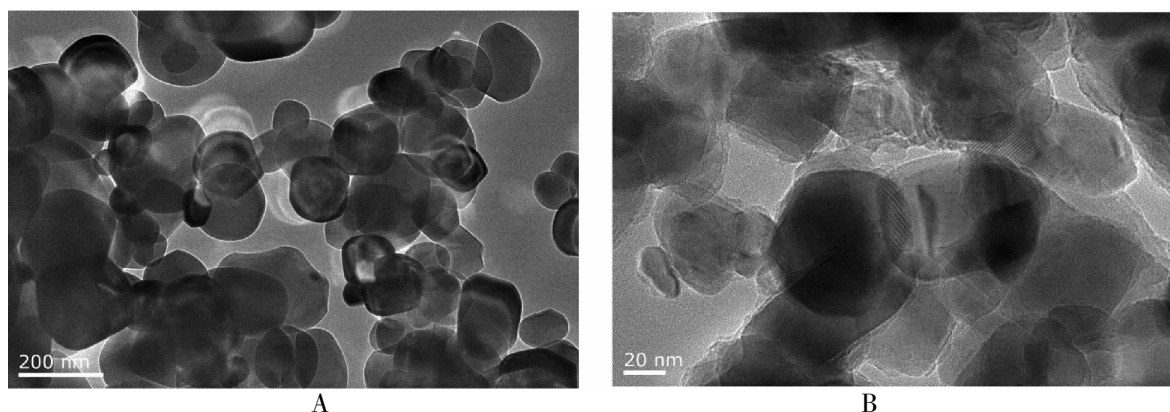
Tab.2 Reaction condition of Q-PCR

名称	条 件
预变性	95 ℃ 1 min
循环 40 次	95 ℃ 15 s→58 ℃ 20 s→72 ℃ 20 s
末端延伸	72 ℃ 5 min
溶解曲线	72 ℃→95 ℃ 每 20 s 升温 1 ℃

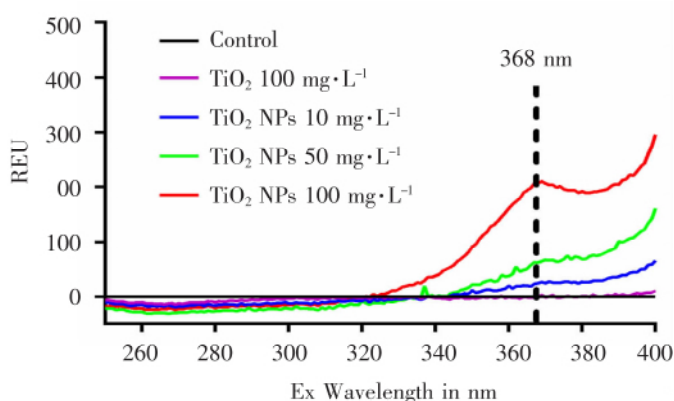
1.6 数据统计和分析 实验数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD), 采用 GraphPad Prism 6.0 软件对数据进行分析处理和作图。数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 不同浓度处理组与对照组之间差异的显著性采用校正的 t 检验。 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。Q-PCR 采用 $\Delta\Delta Ct$ 法, 样品中抗氧化损伤相关的 *sod* 基因的相对 mRNA 表达水平, 可以通过跟对应样品中内参基因 β -actin 基因的表达水平进行比较。

2 结果与分析

2.1 TiO_2 NPs 的物理化学表征 图 1 为常规 TiO_2 (A) 和 TiO_2 NPs (B) 的 TEM 照片。根据图中坐标比例, 常规 TiO_2 的粒径范围 150 ~ 200 nm, TiO_2 NPs 的粒径范围 25 ~ 50 nm, 与所购 TiO_2 NPs (平均粒径 25 nm)。 TiO_2 NPs 悬浮液放置 24 h 后, 会看到有部分 TiO_2 NPs 发生沉淀和聚集。利用 TEM 观察, 此时 TiO_2 NPs 多以团聚体的形式存在于溶液中, 团聚体粒径范围在 100 ~ 150 nm。

图1 常规 TiO_2 和 TiO_2 NPs 透射电镜鉴定A. 常规 TiO_2 ; B. TiO_2 NPsFig.1 TEM Characterization of bulk TiO_2 and TiO_2 NPs

利用分光光度计对几个浓度的 TiO_2 NPs 悬浮液进行测量, 如图 2 所示, TiO_2 NPs 在 368 nm 有吸收值。因此, 可用此波长来比较 TiO_2 NPs 悬浮液的稳定性。测定几个浓度的 TiO_2 NPs 悬浮液在放置 24 h 后 368 nm 条件下光吸收值的变化。发现随着时间的增加, 吸收值减少, 且浓度越高, 变化幅度越大。结果表明, TiO_2 NPs 会随着时间的延长, 发生聚集沉淀, 且高浓度 TiO_2 NPs 悬浮液更容易发生聚集, 与 TEM 结果一致。

图2 TiO_2 NPs 溶液波长扫描Fig.2 Wavelength scan of TiO_2 NPs solution

2.2 斑马鱼 3 种组织中 SOD 含量的 ELISA 检测 根据对 TiO_2 NPs 物理特征的研究,其 24 h 会发生聚集和沉淀,因此,每 24 h 更换新的暴露溶液。在成鱼暴露实验中,10 d 天暴露没有发生成鱼的死亡。取暴露 10 天后的成鱼,解剖分离其肝脏、肠和鳃 3 种组织,组织匀浆后,取上清检测 SOD 的活性。如图 3 所示,在鳃组织当中,与空白对照组相比,常规 TiO_2 组的 SOD 活性变化不大,无显著性差异;而 TiO_2 NPs 中和高浓度组 SOD 活性降低,分别是空白组的 60.3% ($P < 0.05$) 和 38.2% ($P < 0.01$)。在肝脏组织中,常规 TiO_2 组的 SOD 活性与空白对照组相比,无显著性差异; TiO_2 NPs 3 个浓度组 SOD 活性与空白对照组相比均大幅度降低,分别是空白对照组的 58.3% ($P < 0.001$)、38.2% ($P < 0.001$) 和 26.2% ($P < 0.001$)。在肠组织中,仅高浓度 TiO_2 NPs 暴露组中 SOD 活性与其他几组存在显著性差异 ($P < 0.05$),其活性有所升高,是空白对照组的 1.9 倍。3 种组织内,肝脏组织内 SOD 的活性变化最明显,肠组织内 SOD 活性变化最小。导致这一现象的原因可能是:肝脏作为解毒的重要器官,是调节氧化还原代谢的主要场所,SOD 含量较丰富,因而受外界因素影响变化明显。肠组织影响较小的原因可能是, TiO_2 NPs 通过摄食进入小肠后,并未被小肠吸收,因此,对肠组织影响较小。

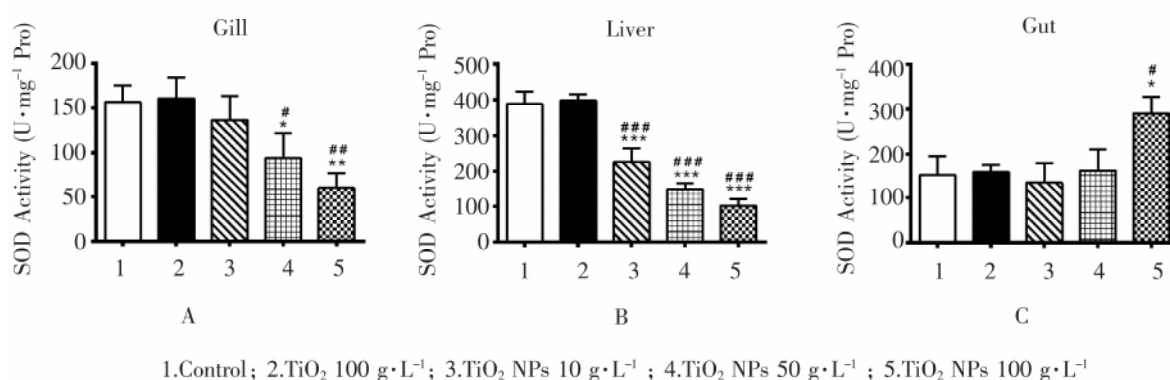


图 3 斑马鱼 3 个组织(鳃、肝脏、肠)的 SOD 活性

A.鳃;B.肝脏;C.肠。数据 means $\pm$ SD ($n = 3$). * 表示与空白对照组相比存在显著差异,*($P < 0.05$),**($P < 0.01$),***($P < 0.001$)# 表示与常规 TiO_2 对照组相比存在显著差异,#($P < 0.05$),##($P < 0.01$),###($P < 0.001$)

Fig.3 SOD activities in zebrafish three tissues (gill, liver and gut)

A. Gills; B. Livers; C. Guts. Data means $\pm$ SD ($n = 3$). * indicates significant difference from the blank control: *($P < 0.05$),**($P < 0.01$),***($P < 0.001$); # indicates significant difference as against the bulk TiO_2 control: # ($P < 0.05$), ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$)

2.3 斑马鱼 3 种组织内 *sod* 基因的表达分析 分别从 5 个组中取出斑马鱼,分离对应组织(鳃、肝脏和肠),分别提取总 RNA。提取的 RNA 样本进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 4)。电泳条带清晰,28S、18S 和 5S 明显。其中肠组织所提取的 Total RNA 总量相对鳃和肝脏少。利用紫外分光光度计对 Total RNA 的纯度和浓度做进一步检测,检测结果见表 3。所有 RNA 光吸收值(A_{260}/A_{280})均在 2.0 左右,证明 RNA 纯度较好,没有蛋白和 DNA 污染,可以满足后续体外反转录实验需要。以所提取 Total RNA 为模板,体外反转录获得相应 cDNA。

对不同斑马鱼 3 种组织样本进行 Q-PCR,分析斑马鱼组织中 *sod* 基因的表达情况。从图 5 可以看出,在 3 个浓度 TiO_2 NPs 暴露 10 d 后的斑马鱼鳃组织中,*sod* 基因表达水平都有提高,相对表达量分别是空白对照组的 1.5 倍 ($P < 0.01$)、1.6 倍 ($P < 0.01$) 和 2.3 倍 ($P < 0.001$)。在肝脏组织中,常规 TiO_2 组和 3 个浓度 TiO_2 NPs *sod* 基因表达水平都有提高,相对表达量分别是空白对照组的 1.6 倍 ($P < 0.05$)、1.8 倍 ($P < 0.05$)、2.4 倍 ($P < 0.01$) 和 3.7 倍 ($P < 0.001$),其中高浓度组基因表达变化显著提高。肠组织中 *sod* 基因相对表达量分别是空白对照组的 1.5 倍 ($P < 0.01$)、1.7 倍 ($P < 0.01$)、2.3 倍 ($P < 0.001$) 和 1.7 倍

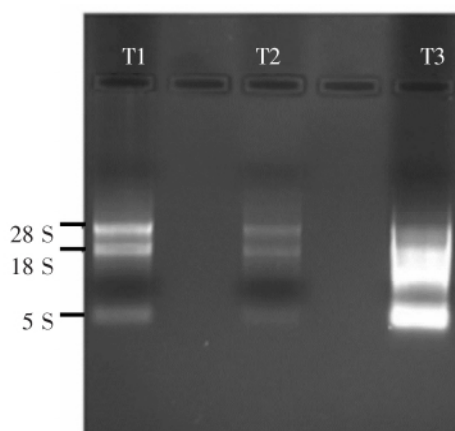


图 4 斑马鱼 3 种组织 RNA 琼脂糖凝胶电泳
T1:鳃;T2:肠;T3:肝脏

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of RNA of zebrafish three tissues
T1: Gills; T2: Gut; T3: Livers

($P < 0.01$) ,都略有上调。结果表明 ,当长时间接触不良物质(TiO_2 NPs) ,斑马鱼可以通过上调相关抗氧化酶基因 ,如 *sod* 基因来提高抗氧化酶的表达量 ,以抵御外界不良刺激 ,防止造成氧化损伤。

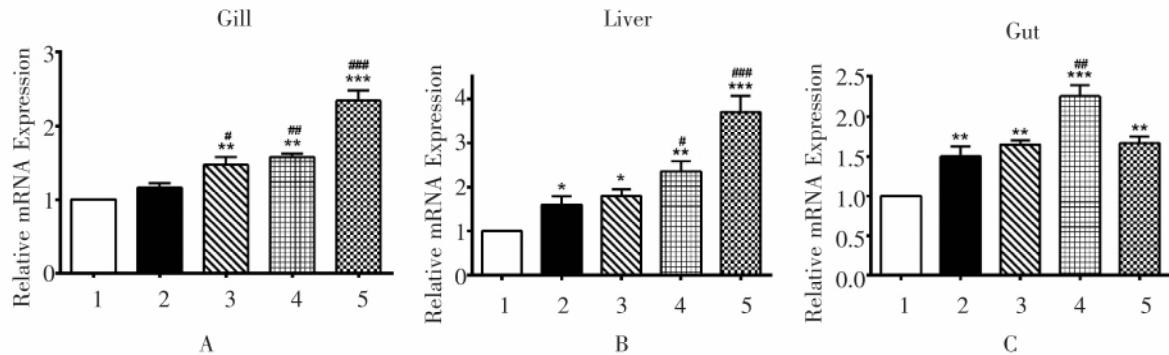
表 3 斑马鱼 3 种组织提取 RNA 浓度和产率

Tab. 3 Concentration and productivity of RNA obtain from zebrafish three tissues

组织	质量/mg	浓度/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	产率/ $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$
肠	46.5	76.8	1.920	1.038	1.85	33.0
鳃	15.7	118.3	2.958	1.640	1.80	150.7
肝脏	17.4	1 323.9	33.098	16.636	1.99	1 521.7

注: 产率即所得 Total RNA 总质量比样品质量

Note: Yield rate means Total weight of total RNA/ sample weight



1. Control; 2. TiO_2 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 3. TiO_2 NPs 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 4. TiO_2 NPs 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 5. TiO_2 NPs 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

图 5 斑马鱼 3 种组织 *sod* 基因相对表达量的变化

A. 鳃; B. 肝脏; C. 肠。数据 means $\pm$ SD ($n = 3$). * 表示与空白对照组相比存在显著差异, * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) # 表示与常规 TiO_2 对照组相比存在显著差异, # ($P < 0.05$), ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$)

Fig. 5 Change in the relative expression level of *sod* gene in zebrafish three tissues

A. Gills; B. Livers; C. Guts. Data means $\pm$ SD ($n = 3$). * indicates significant difference from the blank control: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$); # indicates significant difference as against the bulk TiO_2 control: # ($P < 0.05$), ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$)

3 讨论

随着纳米技术的迅速发展 ,纳米材料在化工、电子、医药、化妆品等多个领域被广泛应用。纳米 TiO_2 更是作为一种重要的纳米材料被广泛用于人类生活之中 ,包括涂料、化妆品、功能纤维、精细陶瓷和催化剂等^[9-10]。笔者就 TiO_2 NPs 对斑马鱼的抗氧化系统关键酶 SOD 的影响进行了研究。对于 TiO_2 NPs 对斑马鱼的影响 ,前期已经有了一些研究 ,但主要是利用斑马鱼胚胎 ,进行 96 h 短期暴露 ,考察 TiO_2 NPs 的急性毒性 ,且实验结果和致毒剂量存在一定的差异^[11-12]。笔者也尝试了胚胎急毒实验 ,但发现所使用的金红型 TiO_2 NPs 没有明显毒性效应。推测实验结果的差异可能是由于 TiO_2 NPs 晶型和粒径的不同 ,造成其毒性效果不同。另外 ,除了理化性质 , TiO_2 NPs 在溶液中的分散状况和沉淀速度也是影响其毒性的重要因素^[13]。

笔者主要利用斑马鱼成鱼对 TiO_2 NPs 导致的氧化损伤毒性进行了研究。SOD 是生物机体系统参与抗氧化损伤的一类重要酶 ,它们活性和含量的变化反映了机体内氧化/抗氧化系统的平衡状况。SOD 可以清除超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot -}$) ,能够与生物体内的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 发生歧化反应 ,将其分解为 H_2O_2 和 O_2 ,维持机体的氧化/抗氧化平衡^[14]。鳃组织是斑马鱼与 TiO_2 NPs 暴露液直接接触的组织器官;而肝脏是调节氧化还原代谢的主要场所;肠道是鱼类吸收营养物和免疫的主要场所 ,是集分泌、免疫和屏障等功能为一体的重要器官。因此 ,笔者重点考察了这 3 个组织内 SOD 的活性以及对应基因的表达情况。

免疫组化实验结果表明 ,鳃和肝脏 2 个组织中 SOD 的活性都较对照组有明显的下降 ,且与空白对照

组和常规 TiO₂ 组相比, SOD 活性的差异具有显著性。而在肠组织中, 低、中 2 个浓度的 TiO₂ NPs 暴露液均未引起 SOD 活性的变化, 而高剂量暴露组中肠内 SOD 活性略有变化。纳米材料毒性研究结果表明: 纳米材料导致产生过量 ROS 及 ROS 诱导的氧化损伤是其制毒的一种重要机制, 过量 ROS 会影响生物的氧化还原系统(谷胱甘肽、硫氧还蛋白等), 破坏氧化平衡, 改变相关酶活性, 导致氧化损伤^[14]。鳃组织直接暴露于 TiO₂ NPs 溶液中, 而 TiO₂ NPs 在光照作用下, 能产生大量 ROS^[13, 15]。正常情况下, 体内的 SOD 等可以清除 ROS, 维持生物体内氧化平衡, 但当 ROS 积累过量, 造成体内抗氧化酶不足, ROS 超出机体自我清除能力, 会导致机体氧化和抗氧化系统失去平衡, 导致 SOD 活性受到抑制^[16-17]。肝脏是调节氧化还原代谢的主要场所, 肝脏内大量的 SOD 可以清除过多活性氧。TiO₂ NPs 可以通过渗透、血液循环进入肝脏组织, 导致肝脏中 ROS 积累, 包括 O₂^{·-} 和过氧化物自由基, 使斑马鱼氧化还原系统受损, SOD 氧化酶活性降低, 发生氧化损伤^[18-19]。与鳃和肝脏相比, TiO₂ NPs 对斑马鱼肠组织氧化损伤的影响较小, 对肠组织结构也未造成损害, 这可能是 TiO₂ NPs 不被消化道细胞吸收和在肠组织不具备生物蓄积性有关^[20]。为了进一步考察 TiO₂ NPs 对 3 种组织氧化损伤的影响, 笔者从基因层面进行了考察, 检测了 TiO₂ NPs 是否对 *sod* 基因的表达有影响。面对不同浓度的暴露液, *sod* 基因在 3 种组织的表达量都有所上调, 通过上调基因表达, 产生更多的 SOD 来抵御 TiO₂ NPs 带来的不利影响。这也符合生物体基本的防御机制。但是由于长期暴露, 过多的 TiO₂ NPs 会积累大量 ROS, 虽然基因表达增多, 但是增加的 *sod* 基因的 mRNA 所翻译出的对应抗氧化酶仍不足以抵消过量的 ROS, 造成斑马鱼鳃和肝脏组织的氧化损伤。笔者在本实验中从蛋白和分子水平对 TiO₂ NPs 诱发的斑马鱼氧化损伤进行了研究, 今后可以借助此方法在微观水平对 TiO₂ NPs 诱发的生物毒性进行系统研究。

参考文献:

- [1] Clemente Z, Castro V L, Jonsson C M, et al. Ecotoxicology of nano-TiO₂: an evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems[J]. International Journal of Environmental Research, 2012, 6(1): 33-50.
- [2] Gaffet E. Nanomaterials: a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development[J]. Materials Science, 2011, 12: 648-658.
- [3] Park C M, Chu K H, Heo J, et al. Environmental behavior of engineered nanomaterials in porous media: a review[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 309: 133-150.
- [4] Nel A, Xia T, Madler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311(5761): 622-627.
- [5] Colvin V L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(10): 1166-1170.
- [6] 吴碧莹. 纳米二氧化钛对水稻的毒性及代谢影响初探[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [7] 郭晴, 刘志敏, 李潇潇, 等. 纳米二氧化钛皮肤暴露对小鼠脑和血管的毒性研究[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(11): 15-20.
- [8] Sipes N S, Padilla S, Knudsen T B. Zebrafish as an integrative model for twenty-first century toxicity testing[J]. Birth Defects Research Part C-Embryo Today: Reviews, 2011, 93(3): 256-267.
- [9] Notarianni M, Liu J, Vernon K, et al. Synthesis and applications of carbon nanomaterials for energy generation and storage[J]. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2016, 7: 149-196.
- [10] Bumbudsanpharoke N, Choi J, Ko S. Applications of nanomaterials in food packaging[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2015, 15(9): 6357-6372.
- [11] Clemente Z, Castro V L, Moura M A, et al. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 147: 129-139.
- [12] Vicario-Pares U, Castanaga L, Lacave J M, et al. Comparative toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, ZnO and TiO₂) to developing zebrafish embryos[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2014, 16: 2550.
- [13] Bar-Ilan O, Chuang C C, Schwahn D J, et al. TiO₂ nanoparticle exposure and illumination during zebrafish development: mortality at parts per billion concentrations[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(9): 4726-4733.
- [14] Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species[J]. Mitochondrion, 2013, 13(2): 71-82.
- [15] Brown D M, Donaldson K, Borm P J, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cy-

- tokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles [J]. American Journal of Physiology Lung Cellular & Molecular Physiology, 2004, 286(2): 344–353.
- [16] 田文静, 白伟, 赵春禄, 等. 纳米 ZnO 对斑马鱼胚胎抗氧化酶系统的影响 [J]. 中国环境科学, 2010, 30(5): 705–709.
- [17] Cuypers A, Plusquin M, Remans T, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge [J]. Biometals, 2010, 23(5): 927–940.
- [18] Dong M, Zhu J, Wang J, et al. Toxic effects of 1-decyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers [J]. Chemosphere, 2013, 91(8): 1107–1112.
- [19] 刘林, 赵群芬, 朱帅旗, 等. 纳米氧化锌对斑马鱼肠组织的氧化损伤 [J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1702–1711.
- [20] 张阳, 朱琳. 不同晶型纳米 TiO₂ 在斑马鱼体内的富集与清除 [J]. 环境科学研究, 2015, 28(1): 52–57.

Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on SOD Activity in Zebrafish

ZHANG Zhang¹, TANG Wenhao¹, TANG Tianle^{1,2}

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. School of Tropical and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

Abstract: An attempt was made to observe the effect of rutile titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) on oxidative damage of zebrafish (*Danio rerio*). Adult zebrafish was exposed to TiO₂ NPs at the concentrations of 10, 50 and 100 mg · L⁻¹ for 10 days with the exposure to the bulk TiO₂ (100 mg · L⁻¹) as the control. Twenty adult zebrafish were treated at each concentration and six fish treated were caught to analyze their changes of superoxide dismutase (SOD) activities in the gills, livers and guts. The SOD was used as a biomarker and the SOD changes at the protein and molecular level were analyzed by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time quantitative PCR (Q-PCR). Results showed that the TiO₂ NPs decreased the SOD activity in the gill and liver tissues of zebrafish but had little effect on the SOD activity in the gut tissue. The *sod* gene expression was up-regulated by 2–3 times in the three tissues. It is concluded that long-term exposure of zebrafish to TiO₂ NPs can give an impact on the SOD level within the body of zebrafish and cause oxidative damage to gills and livers of zebrafish.

Keywords: TiO₂ NPs; zebrafish; superoxide dismutase; enzyme-linked immunosorbent assay; real-time quantitative PCR

(责任编辑: 钟云芳)